



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Gebrauchsmusterschrift**
⑩ **DE 297 24 255 U 1**

⑤ Int. Cl. 7:
B 01 J 13/02
C 12 N 15/88

⑦1 Aktenzeichen: 297 24 255.5
⑥7 Anmeldetag: 18. 12. 1997
aus Patentanmeldung: 197 56 499.2
④7 Eintragungstag: 5. 10. 2000
④3 Bekanntmachung
im Patentblatt: 9. 11. 2000

⑥5 Innere Priorität:
196 52 814. 3 18. 12. 1996

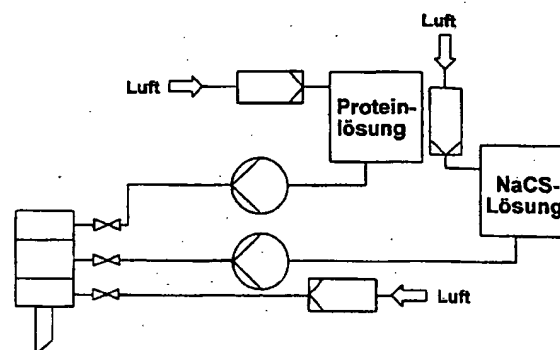
⑦3 Inhaber:
Alpha-Bioverfahrenstechnik GmbH, 14943
Luckenwalde, DE

⑦4 Vertreter:
Dres. Fitzner & Münch, 40878 Ratingen

Rechercheantrag gem. § 7 Abs. 1 GbmG ist gestellt

⑤4 Mikrokapseln

⑤7 Mikrokapseln mit einer Membranhülle, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran herstellbar ist, indem inerte Substanzen und/oder Partikel in die sich bildende Membran eingelagert und anschließend aus der gebildeten Membran entfernt werden.



DE 297 24 255 U 1

DE 297 24 255 U 1

Mikrokapseln

Die vorliegende Erfindung betrifft Mikrokapseln mit einer Membranhülle, wie sie z.B. zur Immobilisierung von Biokatalysatoren verwendet werden.

5

Ein Schwerpunkt biotechnischer Forschung ist die Entwicklung und Applikation von Immobilisierungsmethoden. Unter Immobilisierung versteht man die chemische und/oder physikalische Bindung von wasserlöslichen Biokatalysatoren an einen wasserunlöslichen Träger oder den Einschluß in eine wasserunlösliche Gelmatrix oder
10 Mikrokapsel, unter Erhaltung der enzymatischen Aktivität. Als immobilisierte Biokatalysatoren werden alle Arten von enzymatisch aktivem Material bezeichnet wie Mikroorganismen, isolierte Enzyme, Zellorganellen, pflanzliche und tierische Zellen oder Zellgewebe. Sie werden in analytischen, diagnostischen und industriellen Verfahren eingesetzt.

15

Es gibt keine universellen Träger. Nur wenn die Anwendung eines biologischen Systems definiert ist, können die passenden Träger, die Immobilisierungsmethode und die Reaktorform ausgewählt werden, um eine optimale Einsatzmöglichkeit zu erreichen. Bei der Mikroverkapselung und dem Einschluß in eine Matrix wird der
20 Reaktionsraum durch eine semipermeable Polymermembran begrenzt, die gut substrat- und produkt durchlässig ist, aber völlig undurchlässig für das verkapselte Material. Um dies eindeutig zu gewährleisten, muß die Trenngrenze "cut-off" der Membran bekannt sein. Unter der Trenngrenze versteht man die Ausschlußgrenze für ein Makromolekül bestimmter Größe, bedingt durch den Porendurchmesser der
25 Membran. Die Höhe der Ausschlußgrenze wird in g/mol, der molaren Masse des Moleküls, welches nicht mehr durch die Membran diffundieren kann, angegeben. Die Membran der NaCS/PDADMAC Mikrokapseln (NaCS = Natriumcellulosesulfat; PDADMAC = Polydiallyldimethylammoniumchlorid - s.u.) ist nur für niedermolekulare Stoffe (kleiner als ca. 5.500 g/mol) durchlässig und kann nicht durch
30 die Veränderung der Konzentration eines Reaktionspartners oder der Membranbildungszeit im Reaktionsbad variiert werden, wie es bei den Alginat-Polylysine-Kapseln möglich ist.

Bei der Immobilisierung in Mikrokapseln werden die Biokatalysatoren durch eine
35 Membran eingeschlossen. Besondere Kennzeichen dieser Mikroverkapselung sind eine bestimmte und gleichmäßige Form der Kapsel, höhere mechanische und chemische Beständigkeit als Vollkugeln und ein sehr geringer Verlust an Biokatalysatoren. Die geforderten Eigenschaften der gewählten Ausgangsstoffe sind:

- Bildung einer hydrophilen permeablen Membran,

DE 297 24 255 U1

- Biokompatibilität bezüglich des verwendeten biologischen Materials,
- gute physikalische und chemische Beständigkeit und
- leichte Kapselbildung.

5 Die Mikrokapseln (oder Mikrohohlkugeln) werden mit einer Vertropfungsapparatur hergestellt, die aus einer koaxialen Doppelkapillardüse besteht. Durch die Mantelkapillare wird der Polyelektrolyt und durch die Kernkapillare ein biologisches Material, z.B. Biokatalysatoren in Suspension, in ein Reaktionsbad mit geeigneten Vernetzerionen vertropft. An der Seite kann Luft oder eine Flüssigkeit eingeblasen
10 werden, wenn eine Änderung der Kapselgröße erwünscht ist. So kann der Durchmesser der Kapseln zwischen 0,5 mm und 8 mm variiert werden. Für das NaCS/PDADAMAC Verkapselungssystem (vgl. DD-219 795 A1, DD-274 051) wird eine NaCS-Lösung durch die Mantelkapillare in ein Reaktionsbad mit einer PDADMAC-Lösung vertropft. Die Tropfenbildung erfolgt anhand der schematischen
15 Darstellung in Abbildung 1.

Der Tropfen hängt mit der Kapillarkraft F_K an der Kapillare, bis er unter seiner eigenen Schwere abreißt. Die Gewichtskraft F_G ist kurz vor dem Abreißen gleich der Kapillarkraft F_K . Die Kapillarkraft hängt von der Oberflächenspannung der NaCS-
20 Lösung und dem Durchmesser der Mantelkapillare ab. Zur Verringerung der Tropfendurchmesser kann der Kapillardurchmesser verringert werden, eine oberflächenaktive Substanz in die NaCS-Lösung gemischt werden oder dem System ein Luftstrom L in axialer Richtung aufgeprägt werden. Im letzten Fall liegt dann ein Gleichgewicht zwischen Kapillarkraft und der Summe von Windwiderstandskraft und
25 Gewichtskraft vor. Die Tropfengröße hängt außerdem vom Durchsatz der Biokatalysatorlösung, von der Viskosität der tropfenbildenden Lösung sowie von der Viskosität, Dichte und Oberflächenspannung des Reaktionsbades und der Fallstrecke ab. Die kugelförmige Gestalt der Flüssigkeitstropfen wird durch die Tendenz der Flüssigkeit, ihre Oberfläche so klein wie möglich zu halten, bedingt.

30 Die Membranaufbaureaktion findet im bewegten Reaktionsbad statt. Dies beruht auf der Bildung von Polyelektrolytkomplexen, die durch die Reaktion von entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten entstehen. Das Polyanion ist in diesem System NaCS, ein Derivat der Cellulose, das bei der Umsetzung mit Schwefelsäure entsteht. Die NaCS-
35 Lösung ist die tropfenbildende Lösung. Das Polykation ist PDADMAC. Die PDADMAC-Lösung ist das Reaktionsbad und beinhaltet die Vernetzerionen für die Tropfen.

Bei der Polyelektrolytkomplexreaktion bilden sich Hohlkugeln, da die Vernetzung der Polymere von außen nach innen erfolgt. Mit fortschreitender Reaktion verzögert sich das Wachstum der Membranstärke infolge Verarmung des Kapselinneren an reaktiver Komponente und wachsendem Diffusionswiderstand. Es bilden sich asymmetrische Membranen, deren trennaktive Schicht außen liegt. Durch Zusatz von geringen Mengen an NaCS in das Reaktionsbad erreicht man infolge der Abschirmung ionischer Gruppen eine lockere Fällungsstruktur, höhere Wandstärken und eine erhöhte Kapselstabilität. Als Maß für die mechanische Stabilität der Kapseln wird die Kraft angegeben, die nötig ist, um die Kapseln zu zerstören. Mit diesem Verfahren können Mikrokapseln mit einer Wandstärke von 20 bis 100 µm und einer maximalen Stabilität von 3 bis 5 N gebildet werden.

In Abbildung 2 sind die Polymerstrukturen des NaCS und des PDADMAC dargestellt. Das NaCS besitzt als negativen Elektrolyten eine Sulfat-Seitengruppe, das PDADMAC eine Stickstoff-Seitengruppe als positiven Elektrolyten. Diese reagieren im Reaktionsbad durch Bildung von Ionenbrückenbindungen unter Abspaltung von NaCS. Durch die Reaktion der beiden Polymerelektrolyten bildet sich eine stark vernetzte NaCS/PDADMAC-Membran, die nicht wasserlöslich und nicht löslich in organischen Lösungsmitteln ist. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Membran ist gering. Weiterhin können anorganische Salze die Membran nicht zerstören. Sie ist nicht licht- oder wärmeempfindlich und weist eine hohe mechanische Stabilität auf. Immobilisiert werden können Proteine (Enzyme und Hormone), Zellorganellen (Mikrosomen), Antikörper (anti-TPO), Mikroorganismen (z.B. Pilze und Bakterien), Säugerzellen (Hybridoma) und Zellgewebe (z.B. Langerhanssche Inseln).

Die Attraktivität in der Mikroverkapselung von Biokatalysatoren liegt in der einfachen Trennung des verkapselten biologischen Materials vom Produkt bzw. umgebenden Medium und ihrer Wiederverwendbarkeit, was besonders bei teuren Enzymen und aufwendiger oder produktschädigender Aufarbeitung einen großen Vorteil bietet. Die Polyelektrolytkomplexe sind zudem mechanisch stabiler als der Einschluß in eine Gelmatrix und bieten zusätzlich die Sicherheit, daß keine Enzyme oder Zellen in den extrazellulären Raum gelangen können. Sie bilden durch die Membran eine der natürlichen Zelle nachempfundene Umgebung. Dadurch ist ein Schutz vor Temperatur und pH-Wert Änderungen gegeben. Ein weiterer Vorteil ist die Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren und die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozeßführung. Die NaCS/PDADMAC Mikrokapseln sind biokompatibel.

Werden Enzyme in Mikrokapseln immobilisiert, wird die Kinetik der enzymatischen Reaktion durch Diffusionsvorgänge überlagert. Limitierend wirken die Diffusion des

Substrats durch die stationäre Grenzschicht zwischen Lösung und Kapsel, die Diffusion von der Oberfläche in die Porenstruktur der Kapsel sowie die Rückdiffusion des Produktes aus der Porenstruktur und die Diffusion durch die Grenzschicht. Die Diffusionslimitierung wird bei Enzym-Membranreaktoren, einer weiteren Möglichkeit der Membrantrennung, weitgehend vermieden. Hier tritt aber eine Desaktivierung der Enzyme durch Scherkräfte auf, die beim Umpumpen der Enzymsuspension bei kontinuierlichen Prozessen hervorgerufen werden. Dieser Reaktor wird erfolgreich in der Technik zur kontinuierlichen L-Aminosäure-Produktion durch katalytische Racemattrennung von N-Acetyl-D,L-methionin eingesetzt. Einen Vorteil bietet die Diffusionslimitierung nur für die Verkapselung von Multienzym-Systemen, da dann die Reaktion mit mehreren Enzymen möglich wird. Ein weiterer Nachteil ist die Enzym-Desaktivierung bei der Immobilisierung. Dies kann durch die Immobilisierung von Enzymen in ganzen Zellen eingeschränkt werden, was jedoch den Diffusionswiderstand für Substrat und Produkt durch die zusätzliche Zellwand erhöht.

Die Mikro kapseln werden daher eher für Verfahren in der Zellkulturtechnik, der medizinischen Therapie oder der Sicherheitsfermentation angewendet. In der Sicherheitsfermentation ist die Mikroverkapselung ein Verfahren, das die Arbeit mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Gentechnik-Gesetzes und der Gentechnik-Sicherheitsverordnung erleichtert. In der Medizin werden Mikrohohlkugeln zur Herstellung künstlicher Organe verwendet, die entweder als Implantat oder extrakorporal eingesetzt werden. Dabei werden sowohl körpereigene als auch fremde Zellen genutzt, um stoffwechselphysiologische oder genetisch bedingte Defekte auszugleichen, da durch die Polymermembran eine Immunbarriere geschaffen wird. In der Zellkulturtechnik wird die Schutzfunktion der Membran vor auftretenden Scherkräften (Rührer, Gasblasen) genutzt, um hohe Zelldichten und damit hohe Produktivität zu erzielen. Zusätzlich wird durch die Membran eine effektive Zellzurückhaltung zur Etablierung kontinuierlicher Prozesse bei gleichbleibend hohen Zelldichten erreicht. Versuche auf diesem Gebiet waren mit verschiedenen Systemen erfolgreich. Für die Produktion stabiler Proteine ist es oft wünschenswert, diese in der Kapsel zurückzuhalten, um ein geringeres Volumen aufarbeiten zu müssen. Für eine Applikation in vivo ist es jedoch erforderlich, daß das Produkt die Kapsel verlassen kann.

35

Es können weitere Laborbeispiele für das NaCS/PDADMAC-System gefunden werden wie die Immobilisierung von *Yarrowia lipolytica* Zellen zur Zitronensäureproduktion, wobei die Zellen über lange Zeit aktiv waren; die Verkapselung von Invertase, die durch den Diffusionsprozeß limitiert war; die

Coimmobilisierung von *Yarrowia l.* Zellen und Invertase; die Verkapselung von Urease, die eine höhere Stabilität, aber geringere Aktivität als native Urease durch die Reaktion mit dem restlichen Cellulosesulfat zeigte und die Immobilisierung von *Penicillium raistrickii* i 477, wobei eine höhere Biotrockenmasse als bei freien Zellen
5 festgestellt werden konnte.

Diese Beispiele geben einen kleinen Einblick in die heutige Anwendung mit immobilisierten Biokatalysatoren. Es geht weit über die Anwendung in konventionellen Fermentersystemen wie Bierherstellung, Gewinnung von Essigsäure
10 aus Alkohol und in der Abwasserreinigung hinaus. Je nach Anwendungsfall sind die Anforderungen verschieden. Allgemein sollte die Festigkeit der Kapseln einen Einsatz in konventionellen Fermentersystemen ermöglichen, Materialien und Methoden sind auf ihre schädigende Wirkung auf Organismen zu überprüfen, die Ausschlußgrenze sollte bekannt und wenn möglich einstellbar sein und Nährstoffe und
15 Wachstumsfaktoren müssen die Membran ungehindert passieren können

Am Beispiel des NaCS/PDAMAC- Systems wird deutlich, daß für die Anwendung der Mikrokapsel die Ausschlußgrenze der Kapselhülle von entscheidender Bedeutung ist. Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, die Größe der
20 Ausschlußgrenze in einem bestimmten Bereich variabel und voreinstellbar zu machen. Dadurch sollen Mikrokapseln zu Verfügung gestellt werden, welche den Durchgang von Substraten oder Produkten durch die Hülle bis zum einer vorwählbaren Molekülgröße erlauben. Insbesondere soll die auf ca. 5000g/mol begrenzte Ausschlußgrenze von NaCS/PDAMAC Mikrokapseln erweitert werden.

25 Diese Aufgabe wird durch eine erfindungsgemäße Mikrokapsel mit einer Membranhülle gelöst bei denen die Membran dadurch herstellbar ist, daß inerte Substanzen und/oder Partikel in die sich bildende Membran eingelagert und anschließend aus der gebildeten Membran entfernt werden.

30 Durch die Einlagerung von inerten Substanzen oder Partikeln, welche an der Membranbildungsreaktion nicht teilnehmen, und welche nach Abschluß der Membranbildung aus dieser entfernenbar sind, ist es überraschenderweise gelungen, die wichtige Membraneigenschaft der Ausschlußgrenze beeinflussen zu können. Durch
35 eine entsprechende Wahl der inerten Substanzen/Partikel und ihre Konzentration ist es dabei steuerbar geworden, welche Porengröße in der resultierenden Membran erzielt wird.

Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Mikrokapseln mit Membranen aus Polyelktrolytkomplexen gebildet. Bei diesen Komplexen kann es sich z.B. um solche handeln, die aus Natriumcellulosesulfat (NaCS) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDAMAC) gebildet sind.

5

Bei den inerten Substanzen handelt es sich vorzugsweise Polyalkohole, ganz besonders bevorzugt um Polyethylenglykol (PEG). Polyethylenglykole (PEG) sind wasserlösliche Polymere von über Ätherbindungen polymerisiertem Ethylenglykol mit linearer Sekundärstruktur. Die Formel ist $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$.

10

PEG wird in der Technik zur Fällung von Proteinen benutzt. Die Gemische können anschließend mit der Ultrafiltration getrennt werden. Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Verwendung von PEG mit einer molaren Masse von 10.000 und 20.000 g/mol als Bindungspartner für Coenzyme in Membranreaktoren zur Herstellung von Aminosäuren. Die Beispiele belegen die physiologische Unbedenklichkeit des PEG, da es weder auf Proteine noch auf Coenzyme toxisch wirkt.

Bei den inerten Partikeln kann es sich um biologische Zellen, Liposomen oder Ca-Alginat handeln. Diese Aufzählung ist jedoch nicht vollständig. Geeignet sind alle Partikel, die bezüglich der Membranbildungsreaktion inert sind (d.h. hieran nicht teilnehmen), und welche sich anschließend aus der Membran entfernen lassen. Diese Entfernung kann z.B. durch ein Auswaschen der Partikel oder Substanzen stattfinden.

Vorzugsweise haben die erfindungsgemäßen Mikrokapseln eine Membran Ausschlußgrenze, welche über 5000 g/mol liegt, ganz besonders bevorzugt über 100.000 g/mol bzw. 300.000 g/mol. Derartig hohe Ausschlußgrenzen waren z. B. bei den bekannten NaCS/PDADMAC-Systemen nicht erreichbar und bekannt.

Die erfindungsgemäßen Mikrokapseln haben einen Durchmesser von 0,1-10 mm, vorzugsweise 0,8-8 mm. Die Dicke ihrer Membranhülle liegt bei 10-200 µm, vorzugsweise 20-100 µm.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Mikrokapseln erfolgt in folgenden Schritten:

- a) aus einer Zentralkapillare tritt das Füllmedium für die Mikrokapseln aus,
b) aus einer Mantelkapillare, welche die Zentralkapillare konzentrisch umschließt, tritt eine erste membranbildende Komponente aus und umhüllt den Austrittstropfen des Füllmediums,

c) der sich von den Kapillaren ablösende Tropfen aus erster membranbildender Komponente und Füllmedium fällt in eine zweite membranbildende Komponente, in welcher dann die Reaktion zur Bildung der Membranhülle stattfindet, wobei

- 5 die erste und/oder die zweite membranbildende Komponente inerte Substanzen oder Partikel enthält, welche nach Ausbildung der Membran aus dieser entfernt, vorzugsweise ausgewaschen, werden.

10 Durch den Zusatz der inerten Substanzen/Partikel in die membranbildenden Komponenten werden diese bei der Ausformung der Membran dort eingelagert. Durch den anschließenden Schritt der Entfernung (zum Beispiel durch Auswaschen) werden die inerten Substanzen sodann aus der Membran entfernt und hinterlassen dort entsprechende Lücken.

- 15 Bei dem beschriebenen Verfahren ist die erste membranbildende Komponente vorzugsweise NaCS und die zweite membranbildende Komponente PDADMAC.

20 Als inerte Substanz findet bei dem Verfahren vorzugsweise PEG Verwendung. Das PEG hat dabei vorzugsweise ein Molekulargewicht von 400-10.000 g/mol und wird mit einer Konzentration von weniger als 5 Gewichts Prozent, ganz besonders bevorzugt weniger als 2 Gewichts Prozent in der membranbildende Komponente eingesetzt.

25 Das Verfahren wird ferner vorzugsweise so durch geführt, daß die Mantelkapillare konzentrisch von einer zweiten Mantelkapillare umgeben ist, aus welcher ein Medium strömt, welches die Tropfenformung unterstützt. Dieses Medium ist vorzugsweise Luft oder eine Flüssigkeit.

30 Die Tropfenbildung in der Kapillare erfolgt vorzugsweise bei erhöhter Temperatur, insbesondere in ein Bereich von 30-40°C. Gerade bei NaCS hat sich einer derartige Erhöhung der Temperatur als vorteilhaft erwiesen.

35 Die erfindungsgemäßen Mikrokapsel können verwendet werden, um biologische Zellen einzuschließen. Hierbei kann es sich insbesondere um lebende Insekten- oder Pflanzenzellen handeln. Derartige Zellen können insbesondere für eine Infektion mit rekombinanten, veränderten oder Wildtyp-Viren, Virionen und DNS verwendet werden.

Im folgenden werden die erfindungsgemäßen Mikro kapseln und ihre Herstellung anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

- Für die Herstellung der Mikro kapseln werden zu Beginn des jeweiligen
- 5 Verkapselungsverfahrens die membranbildende Komponente und das Reaktionsbad hergestellt. Dafür werden je Charge die NaCS-Lösung mit 35 g/l NaCS und die PDADMAC-Lösung mit 65 g/l PDADMAC (38,5%ig) + 9 g/l NaCl (0,9%ig) in Phosphatpuffer (pH 6,8) angesetzt. Es werden vier Chargen für folgende Untersuchungen hergestellt:
- 10 1. für die TOC-Wert Bestimmung der Kapselaufbewahrungspuffer von den Kapseln mit unterschiedlichen PEG-Konzentrationen in der Membran,
2. für die Immobilisierung von Cytochrom C und dem E.coli-Zellaufschluß in Kapseln mit unterschiedlichen PEG-Anteilen in der Membran,
3. für die Immobilisierung des Proteingemisches (Combithek, Boehringer, Mannheim)
- 15 in Kapseln mit unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedenen molaren Massen an PEG in der Membran, die TOC-Wert Bestimmung der Kapselaufbewahrungspuffer von Kapseln mit PEG unterschiedlicher molarer Masse in der Membran und deren Stabilitätsmessung, und
4. für die Stabilitätsmessung der Kapseln mit unterschiedlichen PEG-Konzentrationen
- 20 in der Membran.

Um die Verkapselung steril durchzuführen, werden die Lösungen, die Vorlagegefäße, die Verkapselungsapparatur mit Schläuchen, die Behälter für das Reaktionsbad mit Rührer und die Probenbehälter zum Aufbewahren ohne Vergleichsgefäß autokaviert

25 (120°C, 30 min).

- Das Verkapselungsverfahren und die gesamte Apparatur wird im folgenden am Beispiel der Kapselsynthese von Kapseln ohne PEG in der Membran und einer Proteinlösung in der Kapsel erläutert. Die Proteinlösung und die NaCS-Lösung
- 30 werden in SCHOTT-Gläsern vorgelegt und mit der Schlauchpumpe (Schlauchdurchmesser: NaCS-Lösung: 3 mm, Proteinlösung: 0,5 mm) in die Vertropfungsapparatur gepumpt. Die Massenströme der NaCS-Lösung und der Proteinlösung werden durch Auswiegen einer Menge an NaCS-Lösung oder Proteinlösung in einer bestimmten Zeit wie folgt bestimmt:
- 35 1. Einstellung: 29,74 mg NaCS/s; 1,46 mg Proteinlösung/s
2. Einstellung: 35,68 mg NaCS/s; 1,75 mg Proteinlösung/s

Die Lösungen werden mit der 1. Pumpeneinstellung zur Vertropfungsapparatur gepumpt. In Abbildung 3 ist der Verkapselungsprozeß schematisch dargestellt.

- Aus der Vertropfungsapparatur tropfen die Lösungen in das bewegte Reaktionsbad. Das Reaktionsbad mit der PDADMAC-Lösung hat immer das 3fache Volumen der vertropften kapselbildenden NaCS-Lösung. Die Fallstrecke (ca. 0,5 m) und die
- 5 Rührergeschwindigkeit (laminare Strömung) werden so eingestellt, daß sich die Kapseln gut ausbilden können ohne deformiert zu werden.
- Die Kernkapillare der Vertropfungsapparatur hat einen Innendurchmesser $d_i = 0,5$ mm, die Mantelkapillare einen Innendurchmesser $d_i = 1,0$ mm und der Luftkanal einen Durchmesser $D_L = 5$ mm. Die Rührzeit im Reaktionsbad beträgt 45 min. Nachdem die
- 10 Membran ausgebildet ist, werden die Kapseln gründlich und schnell mit Puffer (4fache Menge des Reaktionsbades) und VE-Wasser (2-fache Menge des Reaktionsbades; VE = vollentsalzt) gewaschen und in den Aufbewahrungspuffer gegeben.
- 15 Als Polymer kommt Polyethylenglykol PEG (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) in Frage. Dabei ist zu klären,
1. ob PEG aus der Kapselmembran ausgewaschen wird,
 2. ob die Änderung der PEG-Konzentration bei konstantem Molekulargewicht die Ausschlußgrenze ändert und, wenn dies nicht zutrifft,
 - 20 3. ob die Ausschlußgrenze im direkten Zusammenhang mit der Variation des PEG-Molekulargewichtes steht.

- Zu 1: Um das Auswaschen des Polyethylenglykols zu überprüfen, wurde PEG 10.000 dem NaCS und dem PDADMAC jeweils zu 2, 3, 4 und 5 % zugesetzt , mit dem
- 25 Gemisch Kapseln hergestellt und anschließend in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufbewahrt. Weiterhin erfolgte die Zumischung nur in je einem der Kapselkomponenten. Ein weiterer Schritt war das Untersuchen des Auswaschvorganges mit PEG unterschiedlichen Molekulargewichtes, aber gleicher Konzentration im NaCS und PDADMAC. Dazu wurde PEG der Größe 400, 1000, 3000, 6000, 10.000 und
- 30 20.000 g/mol den Kapselkomponenten zu 2 % zugemischt, Kapseln hergestellt und in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt.
- Anhand der Analyse der Aufbewahrungslösung auf ihren Gehalt an organischem Kohlenstoff sollte überprüft werden, ob PEG aus der Membran ausgewaschen wird. In regelmäßigen Abständen wurden deshalb von der Aufbewahrungslösung je 5 ml
- 35 Probe entnommen und mittels TOC-Messung auf ihren organischen Kohlenstoffgehalt untersucht.

Zu 2: PEG 10.000 wurde 2 und 3 %ig den Kapselkomponenten zugemischt und mit den Mischungen zum einen Cytochrom C (Merck, Darmstadt) verkapselt. Zum zweiten

wurde PEG 10.000 zu 0,5, 1, 2 und 3% zugemischt und damit ein Proteingemisch (Combithek, Boehringer Mannheim) verkapselt. Die Kapseln lagerten im Kühlschrank bei 4°C in Phosphatpuffer und nach drei Tagen wurde der Puffer durch Gelelektrophorese auf Proteine überprüft.

5

Zu 3: NaCS und PDADMAC wurde jeweils 2 % PEG mit dem Molekulargewicht 400, 1000, 3000, 6000, 10.000 und 20.000 zugemischt und damit ein Proteingemisch verkapselt. Lagerung und Probenahme und -analyse entspricht Punkt 2.

- 10 Die entsprechenden Mengen an PEG werden in die membranbildenden Komponenten (entweder in beide oder in eine) gemischt, ohne innere Lösung vertropft, gewaschen und in den Aufbewahrungspuffer gegeben.

- 15 Es wird mit einer Zumischung von 5% PEG mit einer molaren Masse von 10.000 g/mol (PEG 10.000) in die beiden Kapselpolymere begonnen. Dafür werden 50 ml NaCS-Lösung und 150 ml PDADMAC-Lösung mit 5% PEG 10.000 gemischt. Die NaCS/PEG-Lösung wird mit einem Massenstrom von 29,74 mg/s vollständig in das PDADMAC/PEG-Reaktionsbad vertropft. Die Tropfen werden 45 min gerührt, mit 900 ml Phosphatpuffer und 450 ml dest. H₂O gewaschen.

20

- Im nächsten Versuch wird PEG 10.000 mit Konzentrationen von 2%, 3% und 4% in beide Kapselpolymere gemischt. Aus diesen Lösungen werden Kapseln hergestellt, denen PEG entweder in beide oder in eine der beiden Lösungen gemischt wird. Gleichzeitig werden aus diesen Lösungen Kapseln ohne PEG in der Membran
25 hergestellt. Für jede Kapselherstellung werden 50 ml der kapselbildenden Lösung in 150 ml des Reaktionsbades vertropft. Die Tropfen werden wie bereits beschrieben gerührt, gewaschen und in den Aufbewahrungspuffer gegeben.

- Weiterhin werden die Zugabe verschiedener molarer Massen des PEG auf ihre
30 Wirkung auf die Kapseln untersucht. Der Auswaschprozeß wird für die Zumischung von 2% PEG mit einer molaren Masse von 400, 1.000, 3.000, 6.000, 10.000 und 20.000 g/mol und ohne PEG in beide Kapselpolymere bestimmt. Der Vorgang wird für die Zumischung einer molaren Masse kurz erläutert:

- 35 Die NaCS/PEG-Lösung wird 5 min in das PDADMAC/PEG-Reaktionsbad (100 ml) vertropft. Bei dem eingestellten Massenstrom des NaCS mit 29,74 mg/s werden ca. 700 Kapseln hergestellt. Nach 45 min Rühren im Reaktionsbad werden die Kapseln mit 200 ml H₂O und 400 ml Phosphatpuffer gewaschen und in 100 ml Aufbewahrungspuffer gegeben.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Kapselstruktur durch die Zugabe kleiner Mengen an PEG in die Kapselpolymere in ihrer Struktur verändert werden können, ohne an Stabilität zu verlieren.

5

Auch die Größe der PEG-Moleküle hat einen Einfluß auf die Kapselstruktur. PEG mit sehr kleiner molarer Masse (400 g/mol) diffundiert aus der Membran heraus. Seine Größe reicht nicht aus, um die Membranstruktur so aufzulockern, daß eine höhere Ausschlußgrenze erreicht werden kann. Sehr große PEG-Moleküle (20.000 g/mol) sind dagegen schwerer aus der Membran zu lösen.

10

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wird die PEG-Zugabe vorzugsweise auf 1% bis 3% PEG 10.000 und 2% PEG 6.000 in beide Kapselpolymere eingegrenzt. Diese Kapseln sind für Moleküle mit einer relativen Molekülmasse von mindestens 240.000 durchlässig. Die Ausschlußgrenze läßt sich durch die Zugabe von den verwendeten PEG-Konzentrationen oder molaren Massen des PEG in die Kapselpolymere variieren.

15

Ein fakultativ anaerobes Bakterium wie beispielsweise *Escherichia coli* zeigt Anzeichen einer Sauerstofflimitierung bei Einsatz von Kapseln mit einem Durchmesser von mehr als 400 µm bei Kultivierung. Bei Applikation in der Zellkulturtechnik (*Spodoptera frugiperda*, Sf 9) wurden Sauerstofflimitierungen erst ab einem Durchmesser von 800 µm gemessen. Daher sind für den Einsatz aerober Bakterien oder Hefen Kapseln mit Durchmessern um 400 µm und bei Einsatz in der Zellkulturtechnik mit 800 µm erwünscht. Durch eine geringe Modifikation des Verfahrens konnte der Durchmesser der Kapseln wesentlich verkleinert werden. Statt eines gasförmigen Fluides (vorzugsweise sterile Luft) wurde ein flüssiges Trägerfluid eingesetzt. Die Kapseldurchmesser konnten bis auf einen Durchmesser von 0,5 mm reduziert werden.

20

25

Bei einer Variante des erfindungsgemäßen Verkapselungs- und Kultivierungskonzeptes mit der Möglichkeit, in demselben Rührreaktor verkapseln und kultivieren zu können, werden Kontaminationsquellen und aufwendige Arbeitsschritte eingespart.

30

Ausgehend vom Reaktor, der das Abtrennen von flüssigem Trägerfluid und PDADMAC einerseits und der vollständigen Rückhaltung der Kapseln im Kessel garantiert, erfolgen die drei Arbeitsschritte Verkapselung, Spülvorgang und Medienzufuhr sowie Kultivierung im selben Gefäß. Im Gegensatz zum bisherigen

35

Verfahren kann im PDADMAC beim Kapselherstellungsprozeß der Sauerstoffpartialdruck pO_2 gemessen, mitverfolgt und ggf. geregelt werden.

5 Als flüssiges Trägerfluid kann perfluorierte Inertflüssigkeit verwendet werden. In der Inertflüssigkeit löst sich Sauerstoff um ein Vielfaches mehr als in wäßrigen Lösungen. Wird die Flüssigkeit vor dem Verkapselungsprozeß mit Sauerstoff gesättigt, so gibt sie diesen bei der Kapselherstellung langsam an das PDADMAC ab und dient somit zusätzlich als Sauerstoffspeicher.

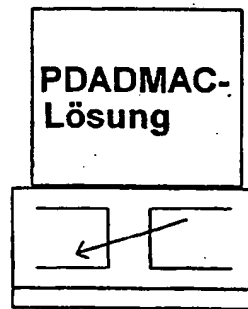
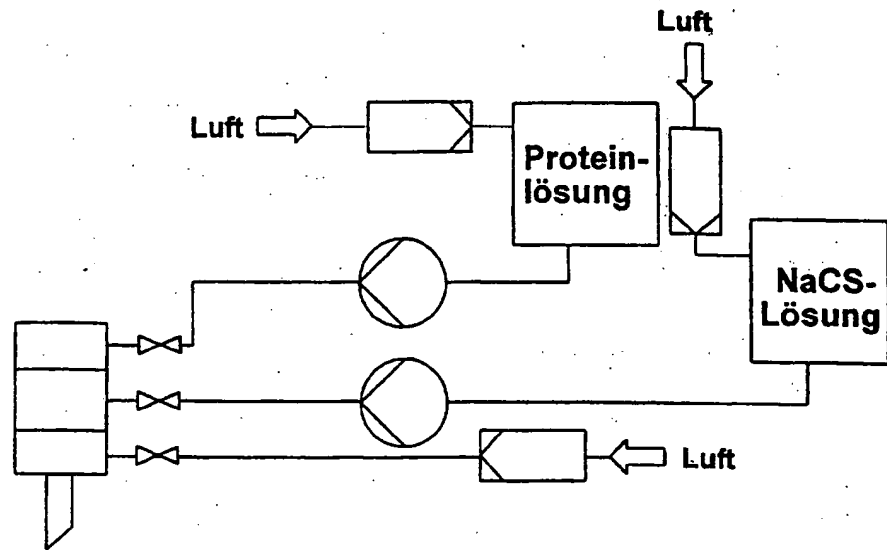
10 Die Immobilisierung in NaCS/PDADMAC Kapseln vereint einige wichtige Vorteile: Sie haben eine hohe mechanische Stabilität und können als Minimembranreaktoren bezeichnet werden, die unter sterilen Bedingungen arbeiten. Sie grenzen das immobilisierte biologische Material von dem Umgebungsvolumen ab und erleichtern dadurch die Produkttrennung sowie die Arbeit mit gentechnisch veränderten
15 Mikroorganismen.

Die Erhöhung der Ausschlußgrenze dieser Membran erweitert ihren Anwendungsbereich deutlich. Zum einen können niedermolekulare Stoffe, wie Glucose und Sauerstoff, durch größere Poren besser diffundieren, zum anderen ist es
20 möglich, daß höhermolekulare Stoffe, wie Proteine, Polysaccharide und Viren, durch die Membran diffundieren können.

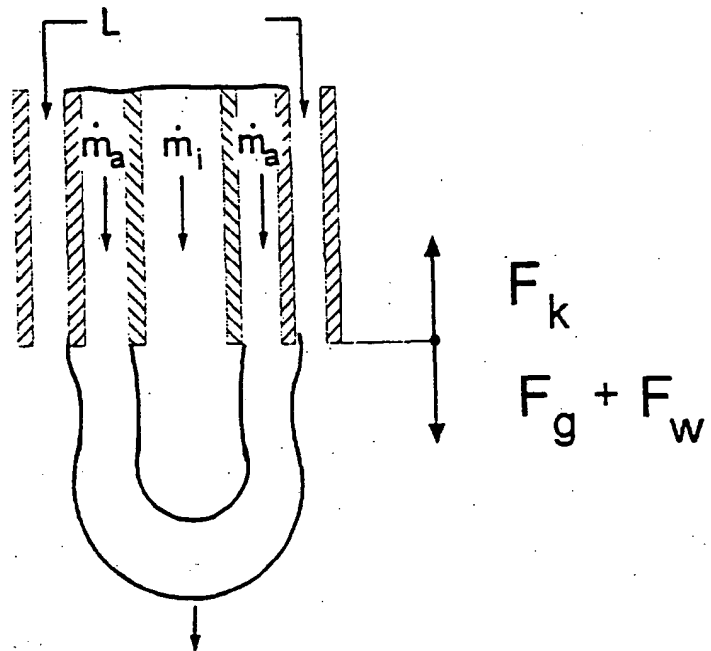
Schutzansprüche

1. Mikrokapseln mit einer Membranhülle,
dadurch gekennzeichnet, daß die Membran herstellbar ist, indem inerte
5 Substanzen und/oder Partikel in die sich bildende Membran eingelagert und
anschließend aus der gebildeten Membran entfernt werden.
2. Mikrokapseln nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus Polyelektrolyten besteht.
- 10 3. Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus Natriumcellulosesulfat (NaCS)
und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) gebildet wird.
- 15 4. Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß die inerten Substanzen Polyalkohole, vorzugsweise
Polyethylenglykol (PEG) sind.
- 20 5. Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die inerten Partikel biologische Zellen, Lysosomen
oder Ca-Alginat sind.
6. Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß die Membranausschlußgrenze über 5000 g/mol liegt,
25 vorzugsweise über 100.000 g/mol, ganz besonders bevorzugt über
200.000 g/mol.
7. Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Durchmesser von 0,1 bis 10 mm,
30 vorzugsweise 0,8 bis 8 mm haben.
8. Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß die Membranhülle eine Dicke von 10 bis 200 µm,
vorzugsweise 20 bis 100 µm hat.

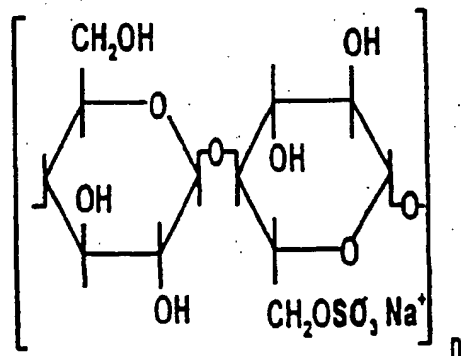
35



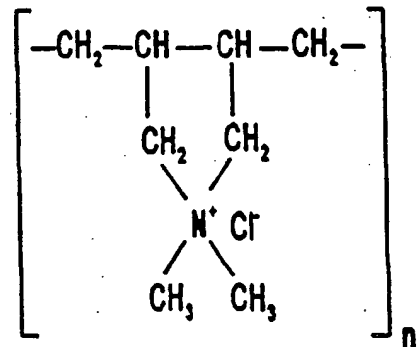
25.07.00



Natrium-Cellulosesulfat
(NaCS)



Polydiallyl-dimethyl-ammonium-chlorid
(PDADMAC)



DE 297 24 255 U1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.